

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: 85104864.5

51 Int. Cl.⁴: **C 12 N 11/04**

22 Anmeldetag: 22.04.85

30 **Priorität: 02.05.84 DE 3416141**
02.05.84 DE 3416142
28.07.84 DE 3427888
28.07.84 DE 3427890

43 **Veröffentlichungstag der Anmeldung:**
06.11.85 Patentblatt 85/45

84 **Benannte Vertragsstaaten:**
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

71 **Anmelder: BAYER AG**
Konzernverwaltung RP Patentabteilung
D-5090 Leverkusen 1 Bayerwerk(DE)

72 **Erfinder: Egerer, Peter, Dr.**
Claudiusweg 7
D-5600 Wuppertal 1(DE)

72 **Erfinder: Haese, Wilfried, Dr.**
Hauweg 20
D-4050 Mönchengladbach-Neuwerk(DE)

72 **Erfinder: Perrey, Hermann, Dr.**
Auf der Rheinaue 8
D-4150 Krefeld 11(DE)

72 **Erfinder: Schmidt-Kastner, Günther, Prof.-Dr.**
Falkenweg 59
D-5600 Wuppertal 1(DE)

54 **Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material.**

57 Die Erfindung betrifft Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen, gegebenenfalls in Perform, das nach diesem Verfahren erhältliche immobilisierte biologische Material und dessen Verwendung zu Biotransformationen.

Sie betrifft ebenfalls Verfahren zur Immobilisierung von Protaminobacter rubrum durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen, das nach diesen Verfahren erhältliche Präparat und dessen Verwendung zu Herstellung von Isomaltulose aus Sucrose.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
Konzernverwaltung RP
Patentabteilung

5090 Leverkusen, Bayerwerk
Bu/m-c

Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen, gegebenenfalls in Perlforn, das nach diesem Verfahren erhältliche immobilisierte biologische Material und dessen Verwendung zu Biotransformationen.

Die Immobilisierung von Biokatalysatoren führt in der Regel zu verfahrenstechnischen und wirtschaftlichen Vorteilen. Es lassen sich chemische und physikalische Eigenschaften, manchmal auch Selektivität und Spezifität des Biokatalysators durch die Immobilisierung modifizieren.

Die Methoden zur Immobilisierung lassen sich allgemein in folgende Gruppen einteilen

- Adsorption an vorgefertigte Träger
 - Kovalente Bindung an Träger
 - Quervernetzung
 - Einschluß in eine Polymermatrix.
- 5 Das Einschlußverfahren beruht darauf, daß das Biomaterial hinsichtlich seines Bewegungsraumes während der Polymerisation in ein Netzwerk mehr oder minder einheitlicher Maschen- und Porenweite eingeschlossen wird. Dieses Polymernetzwerk sollte für den Biokatalysator
- 10 unpassierbar sein, während es dem Substrat und dem Produkt einer an diesem Katalysator durchgeführten Umsetzung praktisch keinen Widerstand bieten sollte.

Herkömmliche Verfahren verwenden niedermolekulare, hydrophile Monomere zum Aufbau des Netzwerkes, beispielsweise

15 Hydroxyethylacrylat, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxypropylacrylat, Hydroxypropylmethacrylat, Acrylamid u.a., die mit der wäßrigen Lösung oder Dispersion des Biomaterials gemischt und anschließend polymerisiert werden.

20 Zum Beispiel werden in der US-PS 3 788 950 monofunktionelle Acrylsäurederivate wie Acrylamid mit einer geringen Menge an Vernetzer wie N,N-Methylenbisacrylamid verwendet. In der US-PS 3 859 169 werden z.B. Monoester der Acrylsäure mit Glykolen in Verbindung mit einem Ver-

netzer und einem löslichen Polymer verwendet. Die US-PS 3 860 490 beschreibt den Einsatz niedermolekularer Hydroxyalkyl-acrylate und -methacrylate zur Bildung des Polymernetzwerkes.

- 5 Bei fast allen Verfahren treten jedoch Schwierigkeiten bei der Steuerung und Reproduzierbarkeit der Permeabilitäten für das biologische Material sowie für dessen Substrate und Produkte auf. Für eine Eignung als Immobilisierungsmaterial sind diese Größen jedoch essentiell.
- 10 Außerdem ist die Verwendung niedermolekularer Acrylsäurederivate wegen ihrer Toxizität nachteilig. Es kann während der Polymerisation zu einer Schädigung des Biokatalysators kommen, oder im Polymerisat befindliche Restmonomere schränken die Verwendung des immobilisierten
- 15 Biokatalysators zur Herstellung von Produkten für die Nahrungsmittelindustrie oder für die pharmazeutische Industrie stark ein.

Bei fast allen diesen Verfahren können jedoch nur durch äußere Formgebung Materialien wie Filme, Folien, Gußteile u.a. erhalten werden. Zur Verwendung dieser Materialien ist oftmals ein nachträgliches Bearbeiten notwendig, womit sich jedoch die für Katalysatoren günstige Kugelform kaum erreichen läßt.

20

Die US-PS 3 860 490 erwähnt die Möglichkeit der Herstellung von Perlen durch Suspensionspolymerisation in einem inerten Medium, jedoch durch die Verwendung niedermolekularer Hydroxy-alkylacrylate und -methacrylate

25

bestehen bei diesem Verfahren die gleichen Nachteile und Schwierigkeiten die oben erwähnt wurden.

Es wurde nun ein Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material durch Einschluß in polymerisierbare Verbindungen gefunden, das im wesentlichen darin besteht, gut wasserlösliche höhermolekulare polymerisierbare Verbindungen als polymerisierbares Material zu verwenden, das zwei oder mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht über 400 besitzt.

Die Erfindung betrifft demnach ein Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material durch Einschluß in polymerisierbare Verbindungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß wäßrige Lösungen oder Dispersionen des biologischen Materials mit einer wäßrigen Lösung von gut wasserlöslichen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen, die zwei oder mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht über 400 besitzen, gemischt werden und die Mischung polymerisiert wird.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäß verwendeten höhermolekularen, bevorzugt zwei oder mehr, ungesättigte Gruppen enthaltenden, härtbaren, wasserlöslichen Verbindungen läßt sich eine bessere Steuerung und Reproduzierbarkeit der Permeabilitäten erreichen, da sich diese Eigenschaften im wesentlichen durch die höhermolekularen, wasserlöslichen Verbindungen ergeben. Außerdem besteht durch die Verwendung von insbesondere höhermole-

kularen Verbindungen kein Toxizitätsproblem. Niedermole-

kulare toxische Verunreinigungen können außerdem vor dem Mischen mit dem biologischen Material entfernt werden.

Desweiteren wurde gefunden, daß die gut wasserlöslichen
5 erfindungsgemäßen Verbindungen zunächst in einer gewis-
sen Menge Wasser, Pufferlösung, Salzlösung und ähnlichem
aufgelöst werden können, womit diese Polymerlösung der
wäßrigen Lösung oder Dispersion des biologischen Mate-
rials hinsichtlich bestimmter Eigenschaften wie pH-Wert,
10 Salzkonzentration, Viskosität u.a. angepaßt werden kann.
Anschließend werden beide Lösungen bzw. die wäßrige Poly-
merlösung und die Zelldispersion gemischt und polymeri-
siert. Dieses Verfahren besitzt besonders Vorteile für
empfindliche Biokatalysatoren, die dadurch keinen abrupten
15 Änderungen des umgebenden Mediums ausgesetzt werden,
wodurch eine Aktivitätseinbuße bei der Herstellung der
polymerisierbaren Mischung weitgehend vermieden wird.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist
die mit der guten Wasserlöslichkeit einhergehende große
20 Aufnahmekapazität des Polymeren für wäßrige Lösungen
und Suspensionen. Es sind Gewichtsverhältnisse von wäß-
rigem biologischem Material zum Polymer zwischen 1:1
und 30:1 möglich, besonders geeignet sind Verhältnisse
zwischen 4:1 und 20:1.

25 Durch den möglichen großen Wassergehalt des immobili-
sierten biologischen Materials vor und nach der Poly-
merisation befinden sich die Biomaterialien in einer

besonders geeigneten, schonenden Umgebung, wodurch die Aktivität stabil gehalten werden kann und wodurch zusätzlich der Substrat- und Produktfluß begünstigt sind. Durch Variation der Struktur und des Molekulargewichts der polymerisierbaren, gut wasserlöslichen, höhermolekularen Verbindungen sind die Eigenschaften des polymeren Netzwerkes in weitem Maße variationsfähig. Dadurch lassen sich die Vernetzungsdichte, die Permeabilität, das Quellverhalten und weitere Eigenschaften optimieren, um den Anforderungen des biologischen Materials zu entsprechen.

Das immobilisierte Biomaterial kann während der Polymerisation durch Formgebung nahezu beliebige Gestalt annehmen. Es sind Folien, Filme, Formteile usw. darstellbar. Weiterhin können durch Einbau von Stützgeweben die mechanischen Eigenschaften modifiziert werden. Ebenso sind Beschichtungen von Elektroden, Membranen, oder anderen Materialien durchführbar.

Weiterhin wurde ein Verfahren zur Herstellung von immobilisiertem biologischem Material durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine wäßrige Lösung oder Dispersion eines biologischen Materials mit einer wäßrigen Lösung von gut wasserlöslichen höhermolekularen polymerisierbaren Verbindungen, die zwei oder mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht von über 400 besitzen, gemischt wird und diese Mischung in einem inerten flüssigen Medium zu Perlen zerteilt und polymerisiert wird. Als Inertphase können insbesondere mit Wasser nicht mischbare Stoffe wie z.B. aliphatische,

cycloaliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe wie z.B. Hexan, Cyclohexan, Toluol sowie auch halogenierte Derivate derselben, des weiteren Alkohole, Ether, Ester oder sonstige, nicht wassermischbare Stoffe wie auch
5 Siliconöle und Paraffinöle dienen, bzw. auch Gemische derselben untereinander.

Die durch dieses Verfahren mögliche Herstellung von Biokatalysatoren in Perlform besitzt besondere Vorteile bei der Verwendung des immobilisierten Biomaterials. Einer-
10 seits eignet sich die Kugelform besonders zur Füllung von Säulenreaktoren, wobei eine gute Durchströmung gewährleistet ist, Verstopfungen vermieden werden können und gleichzeitig durch die große Oberfläche eine gute
15 Reaktionsgeschwindigkeit für die Umsetzung am Biokatalysator resultiert. Auch in strömenden Systemen ist die Kugelform auf Grund der hydrodynamischen Eigenschaften besonders geeignet.

Ferner stellt das vorliegende Verfahren eine Vereinfachung und Verbesserung der bisherigen Verfahren dar.
20 Die Kugelform wird direkt bei der Polymerisation erhalten und ist durch die Verfahrensbedingungen gut steuerbar.

Zum Beispiel kann die Polymerisation in Form einer Dispersion des noch nicht polymerisierten biologischen Materials in einem inerten, flüssigen Medium wie z.B. aliphatischen, cycloaliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, funktionellen Derivaten derselben oder
25 auch Siliconölen, Paraffinölen, durchgeführt werden, wo-

bei in Abhängigkeit von der Verteilung, die durch Rühren, Einleiten von Inertgas, z.B. Stickstoff, oder sonstiges Zudosieren der wäßrigen Phase, z.B. durch Einpumpen oder Einsprühen in die inerte Phase erreicht werden kann, die
5 Größe der Perlen sehr variabel ist. Weiterhin kann durch Zusätze zur Wasser- oder Inertphase deren Viskosität, Dichte, Oberflächenspannung usw. verändert werden, was ebenfalls den Perldurchmesser beeinflusst.

Es sind auf diese Weise mittlere Perldurchmesser von
10 0,05 mm bis 5 mm möglich, wobei Perlen größeren Durchmesser, z.B. größer 2 mm, der gewünschten Reaktion einen hohen Diffusionswiderstand entgegensetzen. Vorteilhaft sind besonders Perlen eines mittleren Durchmessers von 0,2 mm bis 2 mm.

15 Neben der Einfachheit der Herstellung der Perlen ergeben sich Vorteile für die Immobilisierung hinsichtlich der Handhabung unter Sterilbedingungen des Biomaterials, da das Verfahren vom Mischen bis zum fertigen immobilisierten Material in einem geschlossenen System
20 durchgeführt werden kann. Das immobilisierte Biomaterial kann anschließend leicht durch Filtration gewonnen werden. Es ist jedoch auch möglich, die gesamte Mischung unter 0°C abzukühlen, um das Material dadurch längere Zeit lagern zu können. Das Abkühlen kann auch
25 über den Erstarrungspunkt des äußeren Mediums hinaus durchgeführt werden, wobei dessen Erstarrungspunkt ebenfalls durch Zusätze oder Beimengen von anderen Stoffen erniedrigt werden kann.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von immobilisiertem biologischem Material durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Phase, die sowohl das biologische Material als auch höhermolekulare, polymerisierbare Verbindungen enthält, in einer zweiten, nichtwäßrigen Inertphase zu Perlen dispergiert und diese perlförmige Wasserphase polymerisiert wird.

Ein solches Verfahren zur Herstellung von immobilisiertem biologischem Material durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen, ist dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Lösung oder Dispersion eines biologischen Materials mit einer wäßrigen Lösung von gut wasserlöslichen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen, die zwei oder mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht von über 400 besitzen, gemischt wird und diese Mischung in einem flüssigen inerten Medium zu Perlen zerteilt und polymerisiert wird.

Als inertes Medium können insbesondere mit Wasser nicht mischbare Stoffe wie aliphatische, cycloaliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe sowie Derivate derselben, Siliconöle, Paraffinöle bzw. auch Gemische derselben untereinander, verwendet werden.

Das Gewichtsverhältnis Wasserphase zu Inertphase sollte zwischen 1:1 und 1:20 liegen.

Die Zerteilung der wäßrigen Phase zu Perlen kann durch Rühren und/oder durch Durchleiten von Inertgas oder durch Einsprühen der wäßrigen Phase in die Inertphase erfolgen.

- 5 Die Polymerisation durch Bestrahlung mit aktinischem Licht kann unter Zusatz von in der Inertphase schlecht-löslichen oder unlöslichen Photosensibilisatoren erfolgen.

Zur Immobilisierung werden wasserlösliche, höhermolekulare, polymerisierbare Verbindungen, die zwei oder
10 mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht von über 400, insbesondere zwischen 1.000 und 10.000, besitzen, insbesondere Verbindungen mit ethylenisch ungesättigten Gruppen, ver-
15 wendet.

Ihrem Aufbau nach lassen sie sich als Verbindungen beschreiben, die aus der Reaktion von höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen mit Verbindungen, die polymerisierbare ethylenisch ungesättigte Gruppen enthalten, ent-
20 stehen. Beide Reaktionspartner müssen dabei funktionelle Gruppen enthalten, die erlauben, sie chemisch mit- oder untereinander zu verknüpfen bzw. mit Hilfe von di- oder mehrfunktionellen Reagentien mit- oder untereinander zu verknüpfen.

- 25 Beispielsweise sind solche höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen Polyethylenglycole, Ethylenoxid-Propylenoxid-Block- und Mischpolymerisate, alkoxylierte,

- besonders ethoxylierte zwei- oder mehrwertige Alkohole sowie gut wasserlösliche Polymerisate, z. B. ganz oder teilweise verseifte Polyvinylacetate, gut wasserlösliche Polykondensate wie z. B. Polyester, hergestellt
- 5 aus obigen höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen mit Di- bzw. Polycarbonsäuren und gut wasserlöslichen Polyadditionsverbindungen wie z. B. Polyetherpolyurethane, hergestellt aus obigen höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen mit Di- bzw. Polyisocyanaten.
- 10 Ferner können die in den obigen genannten höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen enthaltenen Hydroxylgruppen ganz oder teilweise nach üblichen Verfahren, wie z. B. Umsetzung mit Ammoniak, in Aminogruppen umgewandelt sein.
- 15 Als Verbindungen mit polymerisierbaren, ethylenisch ungesättigten Gruppen sind z. B. geeignet: ungesättigte Carbonsäuren, Säurechloride, Dicarbonsäuren, Säureanhydride oder funktionelle Derivate derselben.

Bevorzugt sind Acrylsäure, Methacrylsäure, Crotonsäure,

20 Acrylsäurechlorid, Methacrylsäurechlorid, Itaconsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Maleinsäureanhydrid, Itaconsäureanhydrid, Glycidylacrylat, Glycidylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat, Hydroxypropylacrylat, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxypropylmethacrylat, Isocyanatoethyl-

25 acrylat, Isocyanatoethylmethacrylat, 4-Isocyanato-3-methyl-but-2-ylacrylat.

Die Verknüpfung der höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen mit den polymerisierbaren, ethylenisch ungesättigten Verbindungen ist somit unterschiedlichster Natur, beispielsweise ergeben sich Ester-, Ether-, Urethan-, Amid-, Amin- und Harnstoffbindungen. Die Herstellung der Verknüpfung kann dabei nach literaturbekannten Verfahren erfolgen, d. h. beispielsweise durch Umsetzung der Hydroxyl- oder Aminogruppen mit Säuren, Säurehalogeniden oder Säureanhydriden zu den entsprechenden Estern oder Amiden, mit Epoxiden zu den entsprechenden Ethern oder Aminen oder mit Isocyanaten zu den entsprechenden Urethanen oder Harnstoffen.

Ferner kann neben der direkten Verknüpfung der höhermolekularen, hydrophilen Verbindungen mit den Verbindungen, die die ethylenisch ungesättigten Gruppen enthalten, die Verknüpfung auch mittels bi- oder mehrfunktioneller Reagentien erfolgen.

Beispiele solcher bi- oder mehrfunktioneller Reagentien sind di- oder mehrfunktionelle Isocyanate wie Isophorondiisocyanat, Toluylendiisocyanat, Hexamethylendiisocyanat, Biuretgruppenhaltige Polyisocyanate (z. B. Desmodur N, Umsetzungsprodukt von Hexamethylendiisocyanat mit Wasser), Polyisocyanate, die aus der Umsetzung von Diisocyanaten mit mehrwertigen Alkoholen entstehen (z. B. Desmodur L, Umsetzungsprodukt von Toluylendiisocyanat mit Trimethylolpropan) sowie Di- oder Polyepoxide wie z. B. Bisphenol-A-diglycidylether oder Hexahydrophthalsäurediglycidylester. Die Verknüpfung dieser Reagentien erfolgt dabei z. B. mit den Hydroxylgruppen der höher-

molekularen, hydrophilen Verbindung und Hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen, die polymerisierbare, ethylenisch ungesättigte Gruppen enthalten, unter Urethan- bzw. Etherbildung.

- 5 Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen können die verschiedenen Verknüpfungsprinzipien auch untereinander kombiniert werden.

Art und Anteil der hydrophilen, höhermolekularen Verbindungen, der Verbindungen, die die ethylenisch ungesättigten Gruppen tragen sowie ggf. der di- oder multifunktio-
10 nellen Reagentien müssen jedoch so gewählt werden, daß die daraus hergestellten erfindungsgemäßen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen so hydrophil sind, daß die gute Wasserlöslichkeit und große Aufnahmekapazität für wäßrige Lösungen oder Dispersionen an biologischem Material gegeben ist.
15

Als bevorzugte wasserlösliche, höhermolekulare, polymerisierbare Verbindungen seien genannt:

- Verbindungen, die aus Polyetherpolyolen, deren Hydroxyl-
20 gruppen teilweise mit ungesättigten Carbonsäuren verestert und zum anderen Teil mit isocyanatgruppenhaltigen Derivaten ungesättigter Carbonsäuren umgesetzt sind, hergestellt sind.

Besonders bevorzugt seien genannt:

- 25 - Verbindungen, die aus Polyethylenglykolen mit einem Molekulargewicht größer 400, deren Hydroxylgruppen teilweise mit Acrylsäure oder Methacrylsäure verestert

und zum anderen Teil mit Isocyanatoethylmethacrylat und/oder 4-Isocyanato-3-methyl-but-2-ylacrylat umgesetzt sind, hergestellt sind.

Bei der Herstellung können die Hydroxylgruppen der Polyetherpolyole zunächst teilweise mit den isocyanatgruppenhaltigen Derivaten ungesättigter Carbonsäuren umgesetzt werden und anschließend zum anderen Teil mit den ungesättigten Carbonsäuren verestert werden, bevorzugt ist jedoch, zuerst die teilweise Umsetzung mit den ungesättigten Carbonsäuren und anschließend die Umsetzung des anderen Teils der Hydroxylgruppen mit den isocyanatgruppenhaltigen Derivaten ungesättigter Carbonsäuren.

Weiterhin seien als bevorzugte, wasserlösliche, höhermolekulare, polymerisierbare Verbindungen genannt:

15 - Verbindungen, die aus Polyetherpolyolen, deren Hydroxylgruppen teilweise mit ungesättigten Carbonsäuren verestert und zum anderen Teil mit di- oder multifunktionellen Isocyanaten umgesetzt sind, hergestellt sind.

Besonders bevorzugt hierbei seien genannt:

20 - Verbindungen, die aus Polyethylenglykolen mit einem Molekulargewicht größer 400, deren Hydroxylgruppen teilweise mit Acrylsäure oder Methacrylsäure verestert und zum anderen Teil mit Isophorondiisocyanat, Toluylendiisocyanat, biuretgruppenhaltigen Polyisocyanaten oder Polyisocyanaten, die aus der Umsetzung von Diisocyanaten mit mehrwertigen Alkoholen entstehen, hergestellt sind.

Bei der Herstellung können die Hydroxylgruppen der Polyetherpolyole zunächst teilweise mit den di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten umgesetzt werden und anschließend zum anderen Teil mit ungesättigten Carbonsäuren verestert werden. Vorteilhafter ist es jedoch, zuerst die
5 teilweise Veresterung und anschließend die Umsetzung mit den di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten durchzuführen.

Die Erfindung betrifft also ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die gut wasserlöslichen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen aus Polyetherpolyolen, deren Hydroxylgruppen teilweise mit ungesättigten Carbonsäuren verestert und zum anderen Teil mit di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten umgesetzt
10 sind, hergestellt sind.

15 Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die Polyetherpolyole Polyethylenglykole mit einem MW von 400 und größer sind,

Die Polymerisation kann unter Inertgas durchgeführt und in Gegenwart üblicher Radikalstarter wie Azo-bis(isobutyronitril), t-Butylperoctoat, Benzoylperoxid, Dicyclohexylperoxydicarbonat, Methyläthylketonperoxid, Cumolhydroperoxid, Acetyl-cyclohexansulfonyl-peroxid, Dicumylperoxid, Kaliumperoxodisulfat oder Ammoniumperoxodisulfat sowie durch Redoxsysteme wie Kaliumperoxodisulfat-Riboflavin, Kaliumperoxodisulfat-Natriumbisulfit, Wasserstoffperoxid-Verbindungen des zweiwertigen Eisens
20
25

erfolgen. Als Beschleuniger können ebenfalls zahlreiche Verbindungen dienen, z. B. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin oder S-Dimethylaminopropionitril.

Eine weitere Möglichkeit der Polymerisation besteht in
5 der Bestrahlung der Mischung mit aktinischem Licht. Es eignen sich beispielsweise Hochdruckquecksilberlampen, Niederdruckquecksilberlampen, Fluoreszenzlampen, Xenonlampen, Kohlelichtbögen sowie Sonnenbestrahlung. Eine Bestrahlung mit Elektronenstrahlen oder Gamma-
10 strahlen ist ebenfalls möglich, jedoch muß mit einer gewissen Schädigung des biologischen Materials gerechnet werden. Ferner kann die Photopolymerisation durch Photosensibilisatoren beschleunigt werden. Es können bekannte Photosensibilisatoren wie α -Carbonylalkohole,
15 z.B. Benzoin oder Acetoin, Acyloinether wie Benzoinmethylether, Benzoinethylether, Benzoinisopropylether, α -substituierte Acyloine wie α -Methylbenzoin und α -Methoxybenzoin u.a. sowie durch ionische Gruppen wie z.B. Carbonsäure-, Sulfonsäure- oder Aminogruppen modifizierte
20 und dadurch wasserlöslich gemachte Derivate verwendet werden.

Des weiteren können polycyclische aromatische Verbindungen wie Naphthol und Hydroxyanthracen, Azoamide wie beispielsweise 2-Cyano-2-butylazoformamid sowie Metallsalze
25 wie Uranylnitrat und Eisenchlorid, wie auch Mercaptane, Disulfide, Halogenide und Farbstoffe verwendet werden.

Durch die hohe Aufnahmekapazität für Wasser - besonders gut eignen sich Gewichtsverhältnisse von wässriger Lösung

Bei der Herstellung können die Hydroxylgruppen der Polyetherpolyole zunächst teilweise mit den di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten umgesetzt werden und anschließend zum anderen Teil mit ungesättigten Carbonsäuren verestert werden. Vorteilhafter ist es jedoch, zuerst die
5 teilweise Veresterung und anschließend die Umsetzung mit den di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten durchzuführen.

Die Erfindung betrifft also ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die gut wasserlöslichen, höher-
10 molekularen, polymerisierbaren Verbindungen aus Polyetherpolyolen, deren Hydroxylgruppen teilweise mit ungesättigten Carbonsäuren verestert und zum anderen Teil mit di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten umgesetzt sind, hergestellt sind.

15 Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die Polyetherpolyole Polyethylenglykole mit einem MW von 400 und größer sind,

Die Polymerisation kann unter Inertgas durchgeführt und in Gegenwart üblicher Radikalstarter wie Azo-bis(isobutyronitril), t-Butylperoctoat, Benzoylperoxid, Dicyclohexylperoxydicarbonat, Methylethylketonperoxid, Cumolhydroperoxid, Acetyl-cyclohexansulfonyl-peroxid, Dicumylperoxid, Kaliumperoxodisulfat oder Ammoniumperoxodisulfat sowie durch Redoxsysteme wie Kaliumperoxodisulfat-Riboflavin, Kaliumperoxodisulfat-Natriumbisulfit,
20 Wasserstoffperoxid-Verbindungen des zweiwertigen Eisens
25

erfolgen. Als Beschleuniger können ebenfalls zahlreiche Verbindungen dienen, z. B. N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin oder β -Dimethylaminopropionitril.

Eine weitere Möglichkeit der Polymerisation besteht in
5 der Bestrahlung der Mischung mit aktinischem Licht. Es eignen sich beispielsweise Hochdruckquecksilberlampen, Niederdruckquecksilberlampen, Fluoreszenzlampen, Xenonlampen, Kohlelichtbögen sowie Sonnenbestrahlung. Eine Bestrahlung mit Elektronenstrahlen oder Gamma-
10 strahlen ist ebenfalls möglich, jedoch muß mit einer gewissen Schädigung des biologischen Materials gerechnet werden. Ferner kann die Photopolymerisation durch Photosensibilisatoren beschleunigt werden. Es können bekannte Photosensibilisatoren wie α -Carbonylalkohole,
15 z.B. Benzoin oder Acetoin, Acyloinether wie Benzoinmethylether, Benzoinethylether, Benzoinisopropylether, α -substituierte Acyloine wie α -Methylbenzoin und α' -Methoxybenzoin u.a. sowie durch ionische Gruppen wie z.B. Carbonsäure-, Sulfonsäure- oder Aminogruppen modifizierte
20 und dadurch wasserlöslich gemachte Derivate verwendet werden.

Des weiteren können polycyclische aromatische Verbindungen wie Naphthol und Hydroxyanthracen, Azoamide wie beispielsweise 2-Cyano-2-butylazoformamid sowie Metallsalze
25 wie Uranylnitrat und Eisenchlorid, wie auch Mercaptane, Disulfide, Halogenide und Farbstoffe verwendet werden.

Durch die hohe Aufnahmekapazität für Wasser - besonders gut eignen sich Gewichtsverhältnisse von wäßriger Lösung

oder Suspension des biologischen Materials zum Polymer zwischen 4:1 und 20:1 - die das immobilisierte Material vor und nach der Polymerisation besitzt, ergeben sich auch Vorteile hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit des
5 Verfahrens. Dadurch können einerseits große Mengen an wäßrigen Lösungen oder Dispersionen des biologischen Materials in einer relativ kleine Menge der polymerisierbaren Verbindungen eingeschlossen werden, andererseits können dadurch Fermenterbrühen direkt oder nach
10 Konzentrierung z.B. durch Mikrofiltration oder Zentrifugieren immobilisiert werden.

Desweiteren ist es jedoch vor und nach der Immobilisierung auch möglich, geringere Menge an Wasser oder wäßrigen Lösungen zu verwenden, sowie einen Teil des
15 Anteils an Wasser gegen andere Flüssigkeiten wie z.B. Alkohole zu ersetzen.

Es ist auch möglich, die immobilisierten biologischen Materialien in anderen als wäßrigen Lösungen, z.B. in aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffen, einzusetzen.
20

Die beschriebenen Verfahren sind dadurch gekennzeichnet, daß Zellen oder Enzyme in Gegenwart von Desinfektionsmitteln, Bakteriziden oder Fungiziden immobilisiert werden, somit chemisch sterilisiert in den Bioreaktor
25 überführt werden und die Sterilisationsmittel vor Anlauf der Reaktion aus dem geschlossenen, sterilen Reaktorsystem ausgewaschen werden.

Die nach vorstehendem Verfahren immobilisierten biologischen Materialien, insbesondere Zellen oder Enzyme, lassen sich als Biokatalysatoren zu Biotransformationen einsetzen.

- 5 Interessante Mikroorganismen für die erfindungsgemäße Immobilisierung sind die folgenden:

Aspergillus niger, Gluconobacter suboxydans,
Gluconobacter oxydans, Escherichia coli,
10 Saccharomyces cerevisiae, Protaminobacter rubrum,
Serratia plymuthica, Pseudomonas putida,
Cunninghamella elegans, Clostridien wie z.B.
Clostridium thermoaceticum, Clostridium
kluveri, Clostridium butyricum, Clostridium
sporogenes, Bacillus licheniformis, Streptomyces
15 olivaceus.

Beispiele

Beispiel 1

Immobilisierung von Alkoholdehydrogenase

48,7 g Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 800 (hergestellt von den Chemischen Werken Hüls) wurde mit
5 4,7 g Acrylsäure unter Zusatz von
0,54 g p-Toluolsulfonsäure und
50 mg Di-tert.-butylhydrochinon sowie
10 50 mg p-Methoxyphenol in Toluol verestert.
25,0 g dieses Esters wurden mit
3,9 g Isocyanatoethylmethacrylat (hergestellt von Dow Chemicals) unter Zusatz von
4 mg Desmorapid S0 (Rheinchemie Rheinau GmbH) umgesetzt.

15 1 g des so erhaltenen polymerisierbaren Harzes wurden mit 50 mg Irgacure 651 (Ciba-Geigy) gemischt und mit 2 g Phosphat-Puffer (pH 7, 0,01 M) versetzt. In dieser Lösung wurde 200 mg Alkoholdehydrogenase (aus Hefe, Fa. Boehringer Mannheim, enthaltend 120 mg Enzymprotein der spezifischen Aktivität 400 U/mg) gelöst,
20 aus der Lösung ein 500 µm dicker Film gezogen und mittels einer Quecksilberhochdrucklampe 10 min. bestrahlt, so daß ein fester Film entstand.

Ein Viertel des so erhaltenen Präparates (entsprechend
25 30 mg Alkohol-Dehydrogenase) wurde in kleine Stücke geschnitten und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bis

zu einem Endvolumen von 20 ml mit 0,1 M Tris. HCl, pH 8,6 enthaltend 142 mg NAD, Li-Salz (Fa. Boehringer, Mannheim), 0,1 M Semicarbazid, 5 % Ethanol p.A. versetzt.

- 5 Der Reaktionslösung wurden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen und nach Verdünnung das UV-VIS Spectrum des entstehenden NADH gemessen. Nach etwa 50 min. war die Gesamtmenge an NAD zu NADH reduziert worden mit einer Initialgeschwindigkeit von 8,1 μ Mol/min. Die immobilisierte Alkohol-Dehydrogenase besitzt somit eine spezifische Aktivität von 0,28 U/mg immobilisiertes Enzymprotein. Das immobilisierte Präparat konnte wiederholt verwendet werden.
- 10

Beispiel 2

- 15 Immobilisierung von Alkoholdehydrogenase

1 g des in Beispiel 1 erhaltenen polymerisierbaren Harzes wurden mit 50 mg 1,2-Diphenyl-2-hydroxy-3/ \bar{N} -(N-methyl)pyrrolidinium-7-propan-1-on-methylsulfat gemischt und mit 15 g Phosphat-Puffer (0,01 M, pH 7) versetzt.

- 20 In dieser Lösung wurde 200 mg Alkoholdehydrogenase (aus Hefe, Fa. Boehringer, Mannheim, enthaltend 120 mg Enzymprotein, 400 U/mg) gelöst und die Lösung in 100 g einer Mischung aus Silikonöl/Paraffinöl mit einer spez. Dichte von 0,9 g/cm³ getropft, wobei sich durch
- 25 intensives Rühren und Durchleiten von Stickstoff Perlen ausbildeten, die durch 15 minütige Bestrahlung mittels einer Hg-Hochdrucklampe polymerisiert wurden.

1,0 g der so erhaltenen Perlen wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml 0,1 M Kaliumphosphat pH 8,5, 10 mM NADH, 1 % Acetaldehyd auf der Rundschtüttelmaschine, 230 rpm, bei 30°C inkubiert.

- 5 Nach 6 h waren etwa 50 % des eingesetzten NADH, 50 µMol, zu NAD oxidiert, die Initialgeschwindigkeit betrug dabei 0,23 µmol/min.

Beispiel 3

Immobilisierung von Lipase

- 10 1 g des polymerisierbaren Harzes aus Beispiel 1 wurde mit 50 mg Irgacure 651 (Ciba-Geigy) gemischt und mit 3 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) versetzt. In dieser Lösung wurde 0,8 g Lipase (aus *Candida cylindracea*, Sigma) dispergiert. Die gesamte Mischung wurde anschlie-
- 15 ßend auf ein Polyamidgewebe (Monodur PA 250 N, Verseidag-Industrietextilien GmbH) verstrichen und mittels einer Quecksilberhochdrucklampe 10 min. bestrahlt, so daß ein fester Film, verstärkt durch das Polyamidgewebe, entstand.
- 20 160 mg Lipase eingeschlossen in obiges Polymer, entsprechend 72 cm² zerschnittener Folie, wurden in 40 ml H₂O mit 2 g Sucrose-Palmitat-Stearat 15 (Fa. Serva, Heidelberg) bei 25°C inkubiert. Freiwerdende Fettsäure wurde mit 0,1 N NaOH per pH-Stat (pH 7,1) titriert.
- 25

Die Aktivität immobilisierte Lipase wurde zu 5,8 mU/mg trockenes Lipase-Präparat errechnet (1 U = 1 µMol freigesetzte Fettsäure pro Minute).

Beispiel 4

5 Immobilisierung von Lipase

197 g Oktaethylenglykol wurden mit 36 g Acrylsäure unter Zusatz von 2 g p-Toluolsulfonsäure und 0,35 g di-tert.-butylhydrochinon sowie 0,35 g p-Methoxyphenol in Toluol verestert. 100 g des so erhaltenen Esters wurden mit
10 47 g Isophorondiisocyanat und 90 mg Desmorapid S0 umgesetzt.

5 g des so erhaltenen polymerisierbaren Harzes wurden in 2 g 0,01 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0, gelöst, mit 6 g einer Lipase-Suspension (Lipase aus Candida
15 cylindracea, Fa. Sigma; 17 % Feststoffgehalt) gemischt und mit 100 mg Irgacure 651 (Ciba-Geigy) versetzt. Diese wäßrige Lipase-Mischung wurde auf ein Polyamid-Stützgewebe (Monodur PA 250 N, Verseidag-Industrie-
textilien GmbH) verstrichen und durch 10-minütige Be-
20 strahlung mit einer Hg-Hochdrucklampe polymerisiert.

72 cm² der so erhaltenen immobilisierten Lipase werden in 40 ml Wasser pH 7,1 eingebracht und mit 1,0 g
Sucrose-Palmitat-Stearat 15 (Fa. Serva, Heidelberg) bei 25°C versetzt. Freiwerdende Fettsäuren werden am
25 pH-Staten mit 0,1 N NaOH titriert. Pro Stunde werden

2,74 ml 0,1 N NaOH verbraucht, was 274 μ Mol freier Fettsäure entspricht. Pro cm^2 immobilisierter Lipase-Folie errechnen sich 0,065 μ Mol/min freiwerdende Fettsäure.

5 Beispiel 5

Immobilisierung von Esterase

25,0 g des hergestellten Esters aus Beispiel 1 wurden mit 2,3 g Desmodur N (Bayer AG, Leverkusen) und 1,4 g Isophorondiisocyanat unter Zusatz von 7,5 mg Des-
10 morapid SO (Rheinchemie Rheinau GmbH) umgesetzt.

5 g des so erhaltenen polymerisierbaren Harzes, 250 mg Irgacure 651 (Ciba-Geigy), 8,5 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) und 3 ml Esterase-Suspension (aus
15 Schweineleber, Boehringer Mannheim GmbH) wurden gemischt und auf einem Polyamidgewebe (Monodur PA 250 N, Verseidag-Industrietextilien GmbH) verstrichen.

Nach Belichten mittels einer Quecksilberhochdrucklampe wurde ein durch das Polyamidgewebe verstärkter Film erhalten.

20 36 cm^2 der so erhaltenen Esterase-Folie wurden in 45 ml 0,1 M Natriumphosphat pH 7,0 mit 5 ml einer 100 mM Lösung von Nitroterephthalsäuredimethylester in Methanol bei 30°C auf einer Rotationsschüttelmaschine inkubiert.

Die Analyse der Reaktionslösung erfolgte per HPLC. Nach 48 h ist keine Ausgangsverbindung mehr nachweisbar. Es bildeten sich die beiden Nitroterephthalsäuremonoester sowie in geringer Menge auch Nitroterephthalsäure.

Beispiel 6

Immobilisierung von L-Lactat-Dehydrogenase

5 g des in Beispiel 5 verwendeten polymerisierbaren Harzes wurden mit 250 mg Phenylglyoxylsäure, 5 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) und 3 ml L-Lactat-Dehydrogenase-Suspension (aus Schweinemuskel, Boehringer Mannheim GmbH, enthaltend 10 mg/ml Enzymprotein, spezifische Aktivität ca. 550 U/mg) gemischt und analog Beispiel 5 zu einem Film verarbeitet.

Die Hälfte des so erhaltenen Films, enthaltend etwa 15 mg Enzymprotein, wurde zerschnitten und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 8,0), 10 mM NADH, 0,05 M Pyruvat-Na-Salz inkubiert. Die Temperatur betrug 30°C, die Reaktionslösung wurde auf einer Schüttelmaschine mit 200 Bewegungen pro Minute geschüttelt.

Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und nach Verdünnung photometrisch die NADH-Abnahme gegen eine Blindprobe ohne immobilisierte L-Lactat-Dehydrogenase

bestimmt. Nach 60 Minuten war die gesamte Menge an NADH zu NAD oxidiert worden. Die Initialgeschwindigkeit wurde zu 3,9 $\mu\text{Mol}/\text{min}$ bestimmt, was einer spezifischen Aktivität von 0,26 U/mg eingeschlossenes Enzymprotein entspricht.

Beispiel 7

Immobilisierung von L-Lactat Dehydrogenase

1 g des in Beispiel 5 erhaltenen polymerisierbaren Harzes wurden mit 50 mg 1,2-Diphenyl-2-hydroxy-3- $\overline{\text{N}}$ -(N-methyl)pyrrolidinium $\overline{7}$ -propan-1-on-methylsulfat gemischt und mit 1,5 g Phosphat-Puffer (0,01 M, pH 7) versetzt. In dieser Lösung wurde 0,6 ml L-Lactat-Dehydrogenase (aus Schweinemuskel, Fa. Boehringer, Mannheim, enthaltend 10 mg/ml Enzymprotein, ca. 550 U/mg) gelöst und die Lösung in 100 g einer Mischung aus Silikonöl/Paraffinöl mit einer spez. Dichte von 0,9 g/cm³ getropft, wobei sich durch intensives Rühren und Durchleiten von Stickstoff Perlen ausbildeten, die durch 15 minütige Bestrahlung mittels einer Hg-Hochdrucklampe polymerisiert wurden.

Die erhaltenen Perlen wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, (pH 8,0), 10 mM NADH 0,05 M Pyruvat-Na-Salz bei 30°C, 200 rpm, inkubiert.

Entnommene Proben wurden nach Verdünnung photometrisch auf die NADH-Abnahme gegen eine Blindprobe getestet.

Nach 3 h war die gesamte Menge an NADH zu NAD oxidiert.
Die Initialgeschwindigkeit betrug 1,4 $\mu\text{Mol}/\text{min}$.

Beispiel 8

Immobilisierung von Bäckerhefe

5 100,0 g Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1.000 (Chemische Werke Hüls) wurde mit 7,2 g Acrylsäure unter Zusatz von 0,92 g p-Toluolsulfonsäure und 0,1 g Di-tert.-butylhydrochinon sowie 0,1 g p-Methoxyphenol in Toluol ver-
10 estert.

75,0 g des so erhaltenen Esters wurde mit 8,3 g Isophorondiisocyanat unter Zusatz von 9 mg Desmorapid S0 umgesetzt.

5,0 g des polymerisierbaren Harzes wurde mit 0,1 g
15 Irgacure 651 (Ciba-Geigy) und 1,0 g Pufferlösung (0,01 M, pH 7) gemischt. Zu dieser Lösung wurde eine Mischung aus 13,7 g Bäckerhefe (25 % Feststoffgehalt) und 13,7 g Pufferlösung (0,01 M, pH 7) gegeben. Die so erhaltene Mischung wurde nach Ausstreichen auf ein
20 Polyamidgewebe mittels einer Quecksilberhochdrucklampe belichtet, so daß ein fester Film entstand.

36 cm^2 des so erhaltenen Films wurden auf ihre NADH-Oxidase Aktivität getestet. Dazu wurde der Film zerschnitten und in einem 200 ml Erlenmeyerkolben bis zu

bestimmt. Nach 60 Minuten war die gesamte Menge an NADH zu NAD oxidiert worden. Die Initialgeschwindigkeit wurde zu 3,9 $\mu\text{Mol/min}$ bestimmt, was einer spezifischen Aktivität von 0,26 U/mg eingeschlossenes
5 Enzymprotein entspricht.

Beispiel 7

Immobilisierung von L-Lactat Dehydrogenase

1 g des in Beispiel 5 erhaltenen polymerisierbaren Harzes wurden mit 50 mg 1,2-Diphenyl-2-hydroxy-3- \bar{N} -(N-methyl)pyrrolidinium-7-propan-1-on-methylsulfat gemischt
10 und mit 1,5 g Phosphat-Puffer (0,01 M, pH 7) versetzt. In dieser Lösung wurde 0,6 ml L-Lactat-Dehydrogenase (aus Schweinemuskel, Fa. Boehringer, Mannheim, enthaltend 10 mg/ml Enzymprotein, ca. 550 U/mg) gelöst und
15 die Lösung in 100 g einer Mischung aus Silikonöl/Paraffinöl mit einer spez. Dichte von 0,9 g/cm³ getropft, wobei sich durch intensives Rühren und Durchleiten von Stickstoff Perlen ausbildeten, die durch 15 minütige Bestrahlung mittels einer Hg-Hochdrucklampe polymerisiert wurden.
20

Die erhaltenen Perlen wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, (pH 8,0), 10 mM NADH 0,05 M Pyruvat-Na-Salz bei 30°C, 200 rpm, inkubiert.

25 Entnommene Proben wurden nach Verdünnung photometrisch auf die NADH-Abnahme gegen eine Blindprobe getestet.

Nach 3 h war die gesamte Menge an NADH zu NAD oxidiert.
Die Initialgeschwindigkeit betrug 1,4 $\mu\text{Mol/min}$.

Beispiel 8

Immobilisierung von Bäckerhefe

5 100,0 g Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1.000 (Chemische Werke Hüls) wurde mit 7,2 g Acrylsäure unter Zusatz von 0,92 g p-Toluolsulfonsäure und 0,1 g Di-tert.-butylhydrochinon sowie 0,1 g p-Methoxyphenol in Toluol ver-
10 estert.

75,0 g des so erhaltenen Esters wurde mit 8,3 g Isophorondiisocyanat unter Zusatz von 9 mg Desmorapid S0 umgesetzt.

5,0 g des polymerisierbaren Harzes wurde mit 0,1 g
15 Ergacure 651 (Ciba-Geigy) und 1,0 g Pufferlösung (0,01 M, pH 7) gemischt. Zu dieser Lösung wurde eine Mischung aus 13,7 g Bäckerhefe (25 % Feststoffgehalt) und 13,7 g Pufferlösung (0,01 M, pH 7) gegeben. Die so erhaltene Mischung wurde nach Ausstreichen auf ein
20 Polyamidgewebe mittels einer Quecksilberhochdrucklampe belichtet, so daß ein fester Film entstand.

36 cm^2 des so erhaltenen Films wurden auf ihre NADH-Oxidase Aktivität getestet. Dazu wurde der Film zerschnitten und in einem 200 ml Erlenmeyerkolben bis zu

einem Endvolumen von 50 ml mit 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 8,0, sowie mit 360 mg NADH (Grad I, Boehringer Mannheim) versetzt und auf einer Rotations-schüttelmaschine mit 200 rpm gegen eine Blindprobe
5 ohne immobilisierte Bäckerhefe bei 30°C inkubiert.

Die immobilisierten Hefezellen oxidierten NADH mit einer Geschwindigkeit von 5,3 $\mu\text{Mol/h}$, gemessen als Mittelwert über 48 h. Diese Reaktion ist zur NAD-Regenerierung mittels O_2 in gekoppelten Enzymsystemen
10 verwendbar.

Beispiel 9

Immobilisierung von Bäckerhefe

218,9 g Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1.550 (Chemische Werke Hüls) wurde mit
15 9,8 g Acrylsäure unter Zusatz von 2,3 g p-Toluolsulfonsäure, 0,23 g Di-tert.-butylhydrochinon sowie 0,23 g p-Methoxyphenol in Toluol verestert.

165,8 g des so erhaltenen Esters wurden mit 18,2 g Isocyanatoethylmethacrylat (Dow Chemicals) unter Zusatz von 36 mg Desmorapid S0 umgesetzt.
20

9,0 g dieses polymerisierbaren Harzes wurden mit 90 mg Irgacure 651 gemischt und mit 2,7 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) versetzt. Diese so erhaltene Lösung wurde zu einer Mischung aus 20,0 g Bäckerhefe

und 20,0 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) gegeben, daraus ein 500 µm dicker Film gezogen und durch Bestrahlung mittels einer Quecksilberhochdrucklampe polymerisiert.

- 5 36 cm² der so erhaltenen Folie wurden auf NADH-Oxidase Aktivität getestet. Die zerkleinerte Folie wurde in 200 ml Erlenmeyerkolben bis zu einem Endvolumen von 50 ml mit 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 8,0, sowie mit 360 mg NADH (Grad I, Fa. Boehringer, Mannheim) ver-
- 10 setzt und auf einer Rotationsschüttelmaschine mit 200 rpm gegen eine Blindprobe der gleichen Zusammensetzung jedoch ohne immobilisierte Bäckerhefe bei 30°C inkubiert. NADH wurde mit einer Geschwindigkeit von 7,4 µMol/h, gemessen als Mittelwert über 48 h, ox-
- 15 diert.

Beispiel 10

Immobilisierung von Bäckerhefe

- 5,0 g des polymerisierbaren Harzes aus Beispiel 8 wurde mit 0,1 g Phenylglyoxylsäure und 1,0 g Puffer-
- 20 lösung (0,01 M, pH 7) gemischt. Zu dieser Lösung wurde eine Mischung aus 13,7 g Bäckerhefe (25 % Feststoffgehalt) und 13,7 g Pufferlösung pH 7 gegeben. Die so erhaltene Mischung wurde anschließend in 200 ml einer Mischung aus Paraffinöl und Siliconöl mit einer spez. Dichte
- 25 von 0,9 g/cm³ unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff in Perlen zerteilt und mittels einer Quecksilberhochdrucklampe polymerisiert.

15 g dieser Perlen wurden in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml 0,01 M Kaliumphosphat, pH 8,0, 1 mM NADH (Grad II, Fa. Boehringer, Mannheim) bei 25°C auf einer Rundschüttelmaschine bei 230 rpm inkubiert.

- 5 Die NADH-Oxidase Aktivität der immobilisierten Hefezellen wurde über die Abnahme des NADH-Gehalts photometrisch gegen eine Blindprobe ohne Hefezellen bestimmt.

15 g immobilisiertes Präparat besaß eine Aktivität von 0,24 U (1 U = 1 μ Mol NADH/min. oxidiert).
10 Diese Reaktion ist zur NAD-Regenerierung in gekoppelten Enzymsystemen anwendbar.

Beispiel 11

Immobilisierung von Bäckerhefe

- 15 9,0 g des polymerisierbaren Harzes aus Beispiel 9 wurden mit 90 mg Phenylglyoxylsäure gemischt und mit 2,70 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) versetzt.

Diese so erhaltene Lösung wurde zu einer Mischung aus 20,0 g Bäckerhefe und 20,0 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) gegeben und daraus analog Beispiel 10 Perlen hergestellt.
20

15 g feuchte Perlen wurden in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml 0,01 M Kaliumphosphat pH 8,0, 1 mM NADH (Fa. Boehringer, Mannheim) bei 25°C auf

einer Rundschüttelmaschine, 230 rpm, inkubiert. Aufgrund der photometrischen NADH-Bestimmung besaßen 15 g Perlen eine Aktivität von 0,14 U.

Beispiel 12

5 Immobilisierung von Bäckerhefe

10 g des polymerisierbaren Harzes aus Beispiel 13 wurden mit 4.0 g Phosphatpuffer (0.01 M, pH 7.0) versetzt, sodaß eine Lösung entstand. Diese so erhaltene Lösung wurde zu einer Mischung aus 17.5 g
10 Bäckerhefe und 17.5 g Phosphatpuffer (0.01 M, pH 7.0) gegeben. Dann wurde darin 0.2 g Ammoniumpersulfat aufgelöst und mit 0.2 g N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin versetzt. Nach intensivem Durchmischen polymerisierte die Lösung nach wenigen
15 Minuten im Becherglas.

Der entstandene Block wurde in kleine Stücke (ungefähr 5 x 5 x 3 mm) zerschnitten und auf NADH-Oxidase Aktivität getestet, analog Beispiel 9. Dabei wurden 10 g des feuchten Polymerisats in den Test eingesetzt.
20 NADH wurde mit einer Rate von 19.3 $\mu\text{Mol/h}$ oxidiert.

Als Kontrollversuch lief ein Parallelansatz gleicher Zusammensetzung ohne immobilisierte Bäckerhefe, bei dem jedoch keine Abnahme des NADH-Gehalts festgestellt wurde.

Beispiel 13

Immobilisierung von Protaminobacter rubrum

110,0 g des Esters aus Beispiel 9 wurden mit
7,4 g Isophorondiisocyanat unter Zusatz von 15 mg
5 Desmorapid SO umgesetzt.

5,0 g dieses so erhaltenen polymerisierbaren Acrylat-
harzes wurden mit 50 mg Irgacure 651 gemischt und
mit 2,0 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) versetzt,
so daß eine Lösung entstand.

- 10 Zur Produktion von Sucrose Mutase wird der Stamm
Protaminobacter rubrum (CBS 574.77) verwendet. Die
Nährlösung besteht aus 5 % Dicksaft, 2 % Mais-
quellwasser und 0,05 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, der pH-Wert
beträgt 7,2. Mit 1 ml einer Protaminobacter rubrum
15 Abschwemmung werden in einem 1 l Erlenmeyerkolben
200 ml Nährlösung beimpft. Die Fermentation läuft
15 h bei 31°C auf der Rundschüttelmaschine.

- Mit dieser Vorkultur werden in einem 30 Liter Fer-
menter 20 Liter obiger Nährlösung angeimpft und
20 16 h bei 31°C fermentiert. Die Fermentationslösung
wurde durch Mikrofiltration um den Faktor 10
konzentriert.

- 17,5 g dieser konzentrierten Fermenterlösung wurde
mit der obigen Acrylatharzlösung vermischt und auf
25 ein Polyamidgewebe (Monodur PA 250 N, Verseidag-

Industrietextilien GmbH) verstrichen. Nach Bestrahlung für 15 Minuten mittels einer Quecksilberhochdrucklampe entstand ein polyamidverstärkter Film.

- 5 Zum Test der immobilisierten *Protaminobacter rubrum* Zellen wurde deren Sucrose Mutase Aktivität gemessen. Hierzu wurden 36 cm² Folie in 50 ml 50 % Sucrose-Lösung pH 7,0, bei 30°C auf einer Rotationsschüttelmaschine inkubiert und zu verschiedenen Zeiten Proben genommen.
- 10 Die Bestimmung des Umsatzes von Sucrose zu Isomaltulose erfolgte per HPLC. Die Umsatzrate betrug 0,60 g/h Sucrose, was 620 U/g Trockenzellen entspricht. 1 µMol/min umgesetzte Sucrose entspricht 1 U.

Beispiel 14

- 15 Immobilisierung von *Protaminobacter rubrum*

Die Anzucht von *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77) erfolgte analog Beispiel 13.

- 20 g des polymerisierbaren Harzes aus Beispiel 9 wurden mit 6 g Phosphatpuffer (0.01 M, pH 7.0) versetzt. Diese so erhaltene Lösung wurde mit 180 g durch Mikrofiltration etwa um den Faktor 10 konzentrierten *Protaminobacter* Zellsuspension vermischt. Nach Auflösen von 0,4 g Ammoniumperoxodisulfat in dieser Lösung wurden 0,4 g N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin zugesetzt, gut durchgemischt und
- 25

schnell in mehrere Schalen gegossen, sodaß die Schichtdicke des ausgegossenen Materials etwa 3 mm betrug. Nach wenigen Minuten setzte die Polymerisation ein, die polymerisierten Scheiben wurden in 5 kleine Stücke der Größe 5 x 5 x 3 mm zerschnitten und in eine 500 ml Säule gefüllt.

Nach Einstellen eines Durchflusses von etwa 90 ml/h wurden bei 30°C 72 % der Sucrose einer 50 % Sucrose-
10 Eine Erhöhung des Durchflusses auf 135 ml/h führte zu
einer Abnahme des Sucroseumsatzes auf 52.7 %.

Beispiel 15

Immobilisierung von *Protaminobacter rubrum*

Zur Produktion von Sucrose Mutase wird der Stamm *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77) verwendet, die Anzucht
15 erfolgte analog Beispiel 13.

10 g des in Beispiel 9 erhaltenen polymerisierbaren Acrylatharzes wurden mit 3,0 g Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7) und 500 mg Irgacure (Ciba-Geigy) gemischt. Zu
20 dieser Lösung wurden 70 g einer durch Mikrofiltration konzentrierten Fermenterbrühe, die *Protaminobacter rubrum* Zellen enthält, gegeben und diese Mischung in 460 g eines Siliconöles mit einer spez. Dichte von 0,95 g/cm³ getropft. Durch intensives
25 Rühren und durch Stickstoffeinleitung wurde eine

Zerteilung der obigen zellenthaltenden Mischung in Perlen erreicht, die mittels 2 Quecksilberhochdrucklampen und 1/2-stündiger Bestrahlung polymerisiert wurden.

- 5 6,0 g der so erhaltenen Perlen wurden in einem 200 ml Erlenmyerkolben mit 50 ml 50 % Sucrose-Lösung, pH 7,0, auf der Rundschtüttelmaschine bei 230 rpm inkubiert. Die Analyse der Reaktionslösung erfolgte per HPLC. Die immobilisierten Protaminobacter Zellen setzten
10 0,32 g/h Sucrose um.

Beispiel 16

Immobilisierung von Protaminobacter rubrum

Die Anzucht von Protaminobacter rubrum (CBS 574.77) erfolgte analog Beispiel 13.

- 15 110 g des Esters aus Beispiel 9 wurden mit 7,4 g Isophorondiisocyanat unter Zusatz von 15 mg Desmorapid S0 umgesetzt.

- 20 10 g des so erhaltenen polymerisierbaren Acrylatharzes wurden mit 4 g Phosphatpuffer 0,01 M, pH 7,0 und 500 mg 1,2-Diphenyl-2-hydroxy-3- \bar{N} -(N-methyl)pyrrolidinium $\bar{7}$ -propan-1-on-methylsulfat und 35 g konzentrierter Fermenterbrühe gemischt und zu 300 g eines Siliconöl-Paraffinöl-Gemisches mit einer spez. Dichte von 0,9 g/cm³ gegeben und analog Beispiel 15 Perlen
25 hergestellt.

6,0 g der so erhaltenen Perlen wurden analog Beispiel 15 mit 50 % Sucroslösung getestet. Die immobilisierten Protaminobacter Zellen setzten 0,69 g/h Sucrose um.

5 Beispiel 17

Immobilisierung von Protaminobacter rubrum

Die Anzucht von Protaminobacter rubrum (CBS 574.77) erfolgte analog Beispiel 13.

10 10 g des polymerisierbaren Harzes aus Beispiel 16 wurden mit 4 g Phosphatpuffer, (0.01 M, pH 7.0), und 35 g konzentrierter Fermenterbrühe gemischt und darin 0,3 g Ammoniumperoxodisulfat gelöst. Diese Mischung wurde in 2000 g eines Siliconöls der Dichte 0,97 g/cm³, in dem 0.3 g N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin gelöst
15 waren, unter starkem Rühren eingetropft, so daß die wäßrige Mischung zu Perlen zerteilt wurde und innerhalb kurzer Zeit polymerisierte.

Die gesamte Perlmasse wurde in eine 25 cm lange Säule des Durchmessers 2 cm gepackt, das anhaftende Siliconöl
20 durch 50 % Sucroslösung verdrängt und die Säule bei 45°C kontinuierlich betrieben.

Bei einem Durchfluß von 28 ml/h wurden 54.5 % der 50 % Sucroslösung zu Isomaltulose und Nebenprodukten umgesetzt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung von biologischem Material durch Einschluß in polymerisierte Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß wäßrige
5 Lösungen oder Dispersionen des biologischen Materials mit einer wäßrigen Lösung von gut wasserlöslichen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen, die zwei oder mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht über 400 besitzen, gemischt werden
10 und die Mischung polymerisiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Phase, die sowohl das biologische Material als auch höhermolekulare, polymerisierbare Verbindungen enthält, in einer
15 zweiten, nichtwäßrigen Inertphase zu Perlen dispergiert und diese perlformige Wasserphase polymerisiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Lösung oder Dispersion eines biologischen Materials mit einer wäßrigen
20 Lösung von gut wasserlöslichen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen, die zwei oder mehr polymerisierbare funktionelle Gruppen pro Molekül und ein Molekulargewicht von über 400 besitzen, gemischt wird und diese Mischung in einem flüssigen
25 inertem Medium zu Perlen zerteilt und polymerisiert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Inertphase insbesondere mit Wasser nicht mischbare Stoffe wie aliphatische, cycloaliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe
5 sowie Derivate derselben, Siliconöle, Paraffinöle bzw. auch Gemische derselben untereinander, verwendet werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Perlen der mittleren Durchmesser
10 0,05 mm bis 5 mm, bevorzugt 0,2 mm bis 2 mm, besonders bevorzugt 0,5 mm bis 1,5 mm demgemäß hergestellt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis Wasserphase
15 zu Inertphase zwischen 1:1 und 1:20 liegt.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zerteilung der wäßrigen Phase zu Perlen durch Rühren und/oder durch Durchleiten von Inertgas oder durch Einsprühen der wäßrigen Phase
20 in die Inertphase erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein radikalischer Polymerisationsinitiator und/oder ein radikalisches Polymerisationsinitiatorsystem und/oder ein Beschleuniger
25 zugesetzt wird.

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein wasserlöslicher radikalischer Polymerisationsinitiator, insbesondere Ammoniumperoxodisulfat und ein wasserlöslicher Beschleuniger wie N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin zugesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Photoinitiator zugesetzt wird und die Polymerisation durch Bestrahlung erfolgt.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerisation durch Bestrahlung mit aktinischem Licht unter Zusatz von in der Inertphase schlechtlösliche oder unlöslichen Photosensibilisatoren erfolgt.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis der wäßrigen Lösung oder der Dispersion des biologischen Materials zu der gut wasserlöslichen polymerisierbaren höhermolekularen Verbindung bzw. deren wäßrigen Lösungen zwischen 1:1 bis 30:1, insbesondere zwischen 4:1 bis 20:1 liegt.
- 20 13. Verfahren nach Anspruch 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die gut wasserlöslichen, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen aus Polyetherpolyolen, deren Hydroxylgruppen teilweise mit ungesättigten Carbonsäuren verestert und zum anderen Teil mit isocyanatgruppenhaltigen Derivaten ungesättigter Carbonsäuren umgesetzt sind, hergestellt sind.
- 25

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) die Polyetherpolyole Polyethylenglykole mit einem MW von 400 und größer sind,
 - 5 b) die ungesättigten Carbonsäuren Acrylsäure und/oder Methacrylsäure sind,
 - c) die di- oder mehrfunktionellen Isocyanate Isophorondiisocyanat, Toluylendiisocyanat, Hexamethylendiisocyanat, biuretgruppenhaltige Polyisocyanate und/oder Polyisocyanate, die aus der
10 Umsetzung von Diisocyanaten mit mehrwertigen Alkoholen entstehen, sind.
15. Verfahren nach Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die gut wasserlösliche, höhermolekularen, polymerisierbaren Verbindungen aus
15 Polyetherpolyolen, deren Hydroxylgruppen teilweise mit ungesättigten Carbonsäuren verestert und zum anderen Teil mit di- oder mehrfunktionellen Isocyanaten umgesetzt sind, hergestellt sind.
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) die Polyetherpolyole Polyethylenglykole mit einem MW von 400 und größer sind,
 - b) die ungesättigten Carbonsäuren Acrylsäure
25 und/oder Methacrylsäure sind,
 - c) die di- oder mehrfunktionellen Isocyanate Isophorondiisocyanat, Toluylendiisocyanat, Hexamethylendiisocyanat, biuretgruppenhaltige Polyisocyanate und/oder Polyisocyanate,
30 die aus der Umsetzung von Diisocyanaten mit mehrwertigen Alkoholen entstehen, sind.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immobilisierung direkt Fermentationsbrühen, gegebenenfalls nach vorhergehender Konzentrierung, verwendet werden.
- 5 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen oder Enzyme in Gegenwart von Desinfektionsmitteln, Bakteriziden oder Fungiziden immobilisiert werden, somit chemisch sterilisiert in den Bioreaktor überführt werden und die Sterilisationsmittel vor Anlauf der
10 Reaktion aus dem geschlossenen, sterilen Reaktorsystem ausgewaschen werden.
19. Immobilisiertes biologisches Material erhältlich nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
- 15 20. Immobilisierte *Protaminobacter rubrum* Zellen erhältlich nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
21. Verwendung des immobilisierten biologischen Materials nach einem der vorgehenden Ansprüche
20 zu Biotransformationen.